全细胞脂肪酶研究进展*

石红璆　查代明**　张炳火　李汉全

（九江学院药学与生命科学学院　九江　332000）

摘要　脂肪酶是一类重要的工业用酶，广泛应用于诸多工业领域。与游离脂肪酶、物理或化学固定化脂肪酶相比，全细胞脂肪酶具有制备简单、无需蛋白质提取纯化、天然固定化、稳定性及抗逆性更好、制备及设备成本较低等优点，因此以全细胞形式利用脂肪酶被誉为是最有前景的降低生物转化成本的方法之一，关于全细胞脂肪酶的研究一直是脂肪酶领域的热点。本文就全细胞脂肪酶的研究进展进行归纳和述评，包括野生型全细胞脂肪酶和基因工程全细胞脂肪酶，并对其未来研究方向做出展望，以期为后续研究提供有益参考。[1]

关键词　全细胞脂肪酶　研究进展　述评

脂肪酶（triacylglycerol acylhydrolases，EC 3.1.1.3）是一类重要的酯解酶，广泛存在于各种生物中，由于微生物脂肪酶具有资源丰富、催化活性多样、遗传操作简单、产量较高、不随季节波动的稳定供应、生产周期短、生产成本低、稳定性好等优点，已成为工业用脂肪酶的主要来源，并被广泛应用于食品、饮料、油脂、洗涤剂、饲料、纺织、皮革、新型材料、精细化工、医药、化妆品、造纸、环境治理、生物能源等工业领域[1-4]。

脂肪酶催化的反应具有高的化学选择性、区域选择性和/或立体选择性，在油水界面上能催化脂肪酸甘油酯水解为甘油和脂肪酸，而在微水相或非水相中能催化多种化学反应，如酯化反应、转酯反应、醇解反应、氨解反应、酸解反应等[5-7]。全细胞脂肪酶（whole-cell lipase）相比游离脂肪酶（free lipase）具有更多的优势：无需繁琐的提取纯化过程，避免了此过程中酶的大量损失及所需的设备投资和运行费用；受到细胞的保护，稳定性及抗逆性更好；简单离心、清洗即可重复利用等[8-10]。由于天然固定化，全细胞脂肪酶克服了物理或化学固定化脂肪酶的许多缺点，如复杂的固定化过程、固定化过程中酶活和/或理化性质的损失、脂肪酶与载体的适配摸索、较高的制备成本等[11, 12]。因此，以全细胞形式利用脂肪酶是降低生物转化成本最有前景的方法之一[9, 11]。根据制备手段的不同，全细胞脂肪酶可分为野生型全细胞脂肪酶和基因工程全细胞脂肪酶，它们之间的比较见表 1。

表 1　野生型全细胞脂肪酶和基因工程全细胞脂肪酶的比较

Table 1　Comparisons of wild-type whole-cell lipases and genetic engineered whole-cell lipases

	Source	Classification	Characteristics
野生型全细胞脂	从自然界中筛选具有	丝状真菌、细菌和放线菌	制备简单，只需从自然界中筛选即

* 九江学院校级科研项目（8500350）

**通信作者，电子信箱：dmzha2015@126.com

肪酶	全细胞脂肪酶活力的野生型菌株		可；来源较丰富；表达效率普遍较低、反应类型较少、反应活性及稳定性较差
基因工程全细胞脂肪酶	通过基因工程手段构建胞内表达或表面展示的基因工程菌	胞内表达型和表面展示型	制备复杂，需通过繁琐的基因工程手段构建；可根据需求选择目的基因和表达宿主；表达宿主来源较少；表达效率较高、反应类型较多、反应活性及稳定性较好

1　野生型全细胞脂肪酶

野生型全细胞脂肪酶是最简单的全细胞脂肪酶，关键在于菌株筛选。该类菌株拥有胞内脂肪酶（intracellular lipase）或细胞结合脂肪酶（cell-bound lipase），能以全细胞形式发挥脂肪酶的催化功能，主要包括丝状真菌、细菌和放线菌。

1.1　丝状真菌

丝状真菌是野生型全细胞脂肪酶的主要来源，其菌丝体作为全细胞催化剂一般以固定化形式应用于生物转化中。大多数情况下，菌丝体的固定化是在发酵过程中自动完成的，其方法是在发酵培养基中添加合适的固体颗粒，比如聚氨酯泡沫材料、聚苯乙烯包装材料等。

1.1.1　根霉属

根霉属（*Rhizopus*）是丝状真菌中野生型全细胞脂肪酶的主要来源，菌丝体具有全细胞脂肪酶活力的类群主要是华根霉（*R. chinesis*）和米根霉（*R. oryzae*）。关于华根霉的研究主要集中在徐岩课题组，该课题组系统研究了华根霉全细胞脂肪酶的酶学性质、发酵条件优化及其作为催化剂在生物转化中的应用[13-17]。

对于米根霉全细胞脂肪酶，多个研究小组利用其作为催化剂制备生物柴油，取得了较高的生物柴油转化率。Tamalampudi 等利用固定化米根霉菌丝体作为全细胞脂肪酶制备生物柴油，60 h 后麻疯树油甲酯得率最高为 80%，反应 5 批次后残余酶相对酯化活力仍高于 90%，而 Novozym 435 作为催化剂反应 90 h 后甲酯得率最高为 76%[18]。王飞课题组利用固定化米根霉菌丝体催化麻疯树油和大豆油制备生物柴油，麻疯树油甲酯得率最高为 82.29%，重复到第 5 批次时脂肪酶基本失活，而大豆油甲酯得率最高为 94%，反应 4 批次后甲酯得率仍可维持在 82%[19, 20]。里伟等利用廉价工业级全脂豆粉为氮源在最优条件下培养米根霉，获得的固定化全细胞脂肪酶在叔丁醇体系中催化大豆油制备生物柴油，24 h 甲酯得率为 68.5%[21]。Hermansyah 等利用两种固定化载体固定米根霉菌丝体，以它们为全细胞脂肪酶催化烹饪油和乙酸甲酯的酯交换反应制备生物柴油，脂肪酸甲酯得率分别为 11%-12%和 22%-23%，在此基础上进行了酯交换反应的动力学模型研究[22]。Zhou 等以商品化皱褶假丝酵母（*Candida rugosa*）脂肪酶和固定化米根霉菌丝体为催化剂，采用两步法工艺催化未精

炼麻疯树油制备生物柴油，商品酶催化的游离脂肪酸得率最高为 90.3%，固定化酶催化的脂肪酸甲酯得率最高为 88.6%，反应 6 批次后产物得率分别为 89%和 79%[23]。Bharathiraja 等比较了固定化纯酶和固定化米根霉菌丝体催化餐饮废油制备生物柴油，同时比较了四种酰基受体对生物柴油得率的影响，纯酶对四种酰基受体的催化效果总体上优于全细胞脂肪酶，甲醇作为酰基受体时生物柴油得率最高，最优条件下脂肪酸甲酯得率分别为 94%和 84%[24]。

1.1.2 曲霉属

曲霉属（*Aspergillus*）是野生型全细胞脂肪酶的重要来源，作为催化剂在食品、生物能源等领域具有潜在的应用价值。Omar 等筛选到一株产细胞结合脂肪酶的黄曲霉（*A. flavus*），并对其产酶条件和酶学性质进行了研究[25]。Yan 等发现米曲霉（*A. oryzae*）菌丝体可作为全细胞脂肪酶，对一系列短链酸和醇类表现出高酯化活力，且对高浓度底物具有强耐受性，反应 48 h 后大多数庚酸酯、部分辛酸酯、己酸正丙酯的得率超过 80%[26]。Li 等筛选到一株黑曲霉（*A. niger*）新菌株，其菌丝体作为全细胞脂肪酶在甘油解反应中具有 1,3-选择性，可用于 1,3-甘油二酯的制备[27, 28]。Guldhe 等利用固定化黑曲霉菌丝体作为全细胞脂肪酶催化微藻油制备生物柴油，甲醇分步加入有助于生物柴油转化率的提高，最优条件下转化率达到 80.97%，反应 2 批次后转化率没有显著性下降[29]。Rakchai 等利用固定化红绶曲霉（*A. nomius*）菌丝体作为全细胞脂肪酶，通过两步反应催化棕榈油制备生物柴油，棕榈油和甲醇的第一步转酯化反应产生的脂肪酸甲酯最高得率为 78.23%，转酯化棕榈油和甲醇的第二步酯化反应进一步使脂肪酸甲酯得率最高提高到 94.77%，反应 10 批次后转酯化活力和酯化活力分别为 90.95%和 100%[30]。

1.1.3 其他丝状真菌

Jacobsen 等和 Druet 等先后发现白地霉（*Geotrichum candidum*）和圆孤青霉（*Penicillium cyclopium*）的菌丝体拥有细胞结合脂肪酶[31, 32]。Yan 等筛选到一株地霉属（*Geotrichum*）菌株，其菌丝体作为全细胞脂肪酶在微水相中将甲醇和油酸酯化为油酸甲酯的 24 h 得率为 94%，8 批次后残余酶相对水解活力为 70%、油酸甲酯得率为 69%[33]。

1.2 细菌和放线菌

Yu 等利用洋葱伯克霍尔德菌（*Burkholderia cepacia*）作为全细胞脂肪酶拆分 DL-乙酸薄荷酯，最优反应条件下 L-薄荷醇转化率为 50%、光学纯度为 96%[34]。Shu 等筛选到一株广谱有机溶剂耐受性菌株 *Burkholderia* sp. ZYB002，对全细胞脂肪酶的生产培养基进行优化后其活力提高了 5.1 倍，产生的全细胞脂肪酶具有良好的高温稳定性和有机溶剂耐受性[8]。Zha 等发现防御假单胞菌（*Pseudomonas protegens*）Pf-5 拥有胞内脂肪酶，可作为全细胞脂肪酶使用，该全细胞脂肪酶具有优良的酶学性质[35]。赖学能等将 6 株脂肪酶高产菌株制备成全细胞生物催化剂，并从中筛选出 2 株具有催化秦皮甲素丙酰化活力的菌株，铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）和施氏假单胞菌（*P. stutzeri*），其中施氏假单胞菌的催化活力更高，最佳产酶诱导剂作用下产物转化率为 47.9%、区域选择性达 99%[36]。

dos Santos 等发现一株棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)可作为全细胞脂肪酶使用，并对其发酵条件、酶学性质及作为生物催化剂在水解反应和酯化反应中的应用潜力进行了研究，该全细胞脂肪酶在长链脂肪酸甘油酯水解、短链脂肪酸酯化和洗涤剂配方中具有较大的应用潜力[37]。

2 基因工程全细胞脂肪酶

一般来说，野生型全细胞脂肪酶的表达效率普遍较低、反应类型较少、反应活性及稳定性较差，因此利用基因工程技术过表达性能优越的天然脂肪酶或蛋白质工程改造的脂肪酶日益成为全细胞脂肪酶的主流。基因工程全细胞脂肪酶的构建主要有两种策略，分别是胞内表达和表面展示。

2.1 胞内表达

基于胞内表达的基因工程全细胞脂肪酶就是在合适的表达宿主细胞内活性过表达性能优越的脂肪酶，然后制备成全细胞生物催化剂应用于生物转化。胞内表达的脂肪酶由于受到细胞壁和细胞膜的保护，作为催化剂在生物转化中的应用会受到细胞渗透性的限制，细胞的透化处理可解除该限制，透化方法主要有溶剂处理（乙醇、异丙醇、甲苯、乙醚、氯仿）、去垢剂处理（Triton X-100、CTAB）、盐处理（NaCl）、冷冻解冻处理、电通透和其他物理化学方法（风干、EDTA、碱）处理等[38]。

Matsumoto 等利用酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）MT8-1 作为宿主胞内活性过表达米根霉脂肪酶 ROL，最高全细胞脂肪酶活力为 474.5 IU/L，经风干透化处理后用于催化大豆油制备生物柴油，165 h 后甲酯得率为 71%[39]。Yan 等在毕赤酵母（*Pichia pastoris*）GS115 细胞内活性过表达疏棉状嗜热丝孢菌（*Thermomyces lanuginosus*）脂肪酶 Tll，其水解活力是固定化 Tll 商品酶 Lipozyme TLIM 的 2 倍，对短链醇的耐受性明显优于 TLIM，作为全细胞生物催化剂用于催化废烹饪油制备生物柴油，84 h 后甲酯得率为 82%，反应 3 批次后甲酯得率为 78%[12]。

Adachi 等在米曲霉菌丝体内活性过表达南极假丝酵母（*Candida antarctica*）脂肪酶 CALB，固定化重组米曲霉菌丝体作为全细胞脂肪酶用于两步法制备生物柴油，6 h 后甲酯得率超过 90%，反应 20 批次后酯化活力没有显著性损失，甲酯得率仍可维持在 90%以上[40]。Amoah 等在米曲霉菌丝体中活性过表达异孢镰刀菌（*Fusarium heterosporum*）脂肪酶 FHL，固定化重组米曲霉用于催化高磷脂油脂制备生物柴油，优化制备工艺后生物柴油得率超过 90%，与游离脂肪酶相比，该全细胞脂肪酶具有良好的反应稳定性[41, 42]。

Zha 等在大肠杆菌（*Escherichia coli*）Top10 中胞内活性过表达防御假单胞菌 Pf-5 脂肪酶 LipA，该全细胞脂肪酶具有优良的酶学性质[35]。

2.2 表面展示

表面展示全细胞脂肪酶是规避细胞渗透性限制的有效方法，经简单离心、冲洗后即可直

接作为催化剂应用于生物转化。根据表达宿主的不同，脂肪酶表面展示可分为细菌表面展示和酵母表面展示。

2.2.1　细菌表面展示

Pan 课题组利用冰核蛋白 INP 作为锚定蛋白将荧光假单胞菌 SIK W1 脂肪酶 TliA 先后展示在大肠杆菌 JM109 和恶臭假单胞菌（*P. putida*）GM730 表面，将大肠杆菌表面展示系统应用于 TliA 随机突变文库的高通量筛选、恶臭假单胞菌表面展示系统应用于三个典型的脂肪酶催化反应，即橄榄油水解、三酰基甘油合成和手性拆分[43, 44]。Lee 课题组采用外膜蛋白 OprF 作为锚定蛋白将 TliA 先后展示在大肠杆菌 XL10-Gold 和恶臭假单胞菌 KT2442 表面，并将这两种表面展示系统应用于(±)-1-苯乙醇的手性拆分，与大肠杆菌表面展示系统相比，恶臭假单胞菌表面展示系统在酶活力、有机溶剂耐受性、温度稳定性、手性拆分能力等方面表现出更大优势[45, 46]。

Kim 等采用自转运蛋白 EstA 的β8 肽段作为锚定基序将溶血葡萄球菌（*Staphylococcus haemolyticus*）L62 脂肪酶展示在大肠杆菌 BL21(DE3)表面，并应用于橄榄油制备生物柴油，96 h 后甲酯得率为 89.4%[47]。黎小军等以杂合肽段 Lpp-OmpA 为锚定基序将洋葱伯克霍尔德菌 XYU-6 脂肪酶 BCL 展示在大肠杆菌 BL21(DE3)表面，其脂肪酶活力是野生菌的 3.9 倍[48]。李春华课题组以超折叠绿色荧光蛋白 C 端结构域 sfGFP 为锚定基序将变形杆菌（*Proteus sp.*）脂肪酶 LipA 成功展示在大肠杆菌 Rosetta Blue(DE3)表面，表现出优良的酶学性质和较高的生物柴油转化率[49, 50]。

陈华友课题组使用芽胞衣壳蛋白 CotB 作为锚定蛋白将海栖热袍菌（*Thermotoga maritima*）MSB8 脂肪酶 Tm1350 展示在枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）的芽孢表面，其最适温度、最适 pH、温度稳定性和 pH 稳定性均高于游离脂肪酶，并且表现出良好的可重用性，在此基础上系统研究了不同连接肽对芽孢表面展示脂肪酶活力的影响[51, 52]。Kim 利用芽胞衣壳蛋白 CotE 作为锚定蛋白分别将枯草芽孢杆菌脂肪酶 LipA 和 LipB 展示在枯草芽孢杆菌的芽孢上，LipB 的展示活力高于 LipA 的展示活力，芽孢展示 LipB 对有机溶剂的耐受性优于游离 LipB[53]。

2.2.2　酵母表面展示

自从 Washida 等 2001 年首次将脂肪酶成功展示在酵母细胞以来[54]，酵母表面展示日益成为构建全细胞脂肪酶的主要策略。纵观发展历程，脂肪酶的酵母表面展示系统先后经历了酿酒酵母表面展示系统和毕赤酵母表面展示系统，期间还发展了一些其他酵母表面展示系统。由于毕赤酵母的诸多优点[55, 56]，脂肪酶表面展示系统近年来逐渐形成了以毕赤酵母表面展示系统为主、其他酵母表面展示系统为辅的发展趋势。

Li 等以细胞壁蛋白 Sed1p 为锚定蛋白将米根霉脂肪酶 ROL 展示在毕赤酵母 GS115 表面，具有较宽的温度和 pH 稳定性，最适温度和 pH 分别为 40 ℃和 7.5[57]。Moura 等以絮凝素蛋白 Flo9 或内部重复蛋白 Pir1 为锚定蛋白将南极假丝酵母脂肪酶 CALB 展示在毕赤酵母 X-33

表面，最适温度和 pH 分别为 45 ℃和 7.0，较游离脂肪酶具有更好的温度稳定性和有机溶剂耐受性[58]。Wang 等以细胞壁蛋白 GCW61 为锚定蛋白将南极假丝酵母脂肪酶 CALB 和疏水蛋白 SC3 或 HFBI 共展示在毕赤酵母 GS115 表面，同时研究了疏水蛋白对共展示 CALB 酶活力的影响，结果表明 HFBI 显著性增强 CALB 的酶活力，而 SC3 显著性抑制 CALB 的酶活力[59]。

张蕊以凝集素蛋白 Aga2-Aga1 为锚定蛋白将米根霉脂肪酶 ROL 展示在酿酒酵母 EBY100 表面，最适温度和 pH 分别为 40 ℃和 7.5，具有良好的稳定性和有机溶剂耐受性，海藻酸钠固定化全细胞脂肪酶制备生物柴油得率为 81.2%，反应 7 批次后转酯率仍保持 80%以上[60]。Yuzbasheva 等以细胞壁蛋白 YlPir1p 为锚定蛋白将解脂耶氏酵母（*Yarrowia lipolytica*）脂肪酶 Lip2p 展示在解脂耶氏酵母 Po1f 表面，与游离脂肪酶相比，表面展示脂肪酶表现出更高的温度稳定性、有机溶剂耐受性和表面活性剂耐受性，作为全细胞催化剂用于制备生物柴油，第一轮反应 33 h 后甲酯得率为 84.1%，第二轮反应 45 h 后甲酯得率为 71%[61]。

闫云君课题组系统研究了锚定蛋白、连接序列、启动子和表达宿主对脂肪酶表面展示的影响、脂肪酶表面共展示及展示顺序对共展示效果的影响、酶学性质、发酵条件优化及作为催化剂在生物转化中的应用，他们在脂肪酶的酵母表面展示方面也经历了从酿酒酵母表面展示系统到毕赤酵母表面展示系统的发展历程[54, 55, 62-66]。

3 展望

虽然与游离脂肪酶相比，全细胞脂肪酶是基于细胞的复杂酶体系，其他酶的存在使其催化的反应容易产生副产品、催化反应时细胞载体中的内容物容易泄漏污染终产品，导致终产品中杂质较多，从而终产品的纯化较繁琐、纯化成本较高，其应用受到很大的限制，但是全细胞脂肪酶具有制备简单、无需蛋白质提取纯化、天然固定化、稳定性及抗逆性良好、可重复利用等优点，在生物转化中的使用被誉为是降低工业成本的最有前景的方法之一，一直是受到脂肪酶研究人员的青睐。迄今为止，关于全细胞脂肪酶已开展了大量的研究，并取得了丰硕的研究成果，但是在天然全细胞脂肪酶资源的挖掘、胞内表达全细胞脂肪酶的构建、表面展示全细胞脂肪酶的构建、生物转化领域的应用等方向仍需开展大量而深入的研究，具体研究内容展望见表 2。

表 2 全细胞脂肪酶的未来研究方向

Table 2 Future research directions of whole-cell lipases

Research directions	Research contents
天然全细胞脂肪酶资源的挖掘	极端环境中筛选具有优良酶学性质的天然全细胞脂肪酶
胞内表达全细胞脂肪酶的构建	宿主资源的挖掘、脂肪酶基因资源的挖掘、表达载体的优化构建、细胞透化技术的开发
表面展示全细胞脂肪酶的构建	宿主资源的挖掘、锚定蛋白的开发、连接肽的影响、多蛋白共展示

	技术的开发、展示载体的优化构建
生物转化领域的应用	反应类型的拓展及其反应条件的优化

参考文献

[1] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 763-781.

[2] Arpigny J L, Jaeger K E. Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties. Biochemical Journal, 1999, 343(1): 177-183.

[3] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 390-397.

[4] 查代明, 张炳火, 李汉全, 等. 假单胞菌属脂肪酶的分子生物学研究进展. 中国生物工程杂志, 2015, 35(9): 114-121.

Zha D M, Zhang B H, Li H Q, et al. Research advances in molecular biology of *Pseudomonas* lipases. China Biotechnology, 2015, 35(9): 114-121.

[5] Angkawidjaja C, Kanaya S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. Cellular and Molecular Life Sciences, 2006, 63(23): 2804-2817.

[6] 舒正玉. 黑曲霉脂肪酶的酶学性质、基因克隆与表达及结构预测. 武汉: 华中科技大学, 2007.

Shu Z Y. Biochemical characterization, gene cloning and expression and structure prediction of lipase from *Aspergillus niger*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2007.

[7] Panizza P, Syfantou N, Pastor F I, et al. Acidic lipase Lip I.3 from a *Pseudomonas fluorescens*-like strain displays unusual properties and shows activity on secondary alcohols. Journal of Applied Microbiology, 2013, 114(3): 722-732.

[8] Shu Z Y, Wu J G, Cheng L X, et al. Production and characteristics of the whole-cell lipase from organic solvent tolerant *Burkholderia* sp. ZYB002. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(3): 536-548.

[9] 陈美龄. 全细胞脂肪酶生物催化剂的构建及其在生物转化中的应用. 杭州: 浙江大学, 2012.

Chen M L. Construction of lipase whole-cell biocatalyst and its application in bioconversion. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.

[10] 周力超. 应用于油脂废水处理的全细胞脂肪酶的构建及其应用. 武汉: 湖北大学, 2012.

Zhou L C. Construction of whole-cell lipase and its application for oil waste water treatment. Wuhan: Hubei University, 2012.

[11] Jin Z, Han S Y, Zhang L, et al. Combined utilization of lipase-displaying *Pichia pastoris* whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media. Bioresource Technology, 2013, 130: 102-109.

[12] Yan J, Zheng X, Li S. A novel and robust recombinant *Pichia pastoris* yeast whole cell biocatalyst with

intracellular overexpression of a *Thermomyces lanuginosus* lipase: preparation, characterization and application in biodiesel production. Bioresource Technology, 2014, 151: 43-48.

[13] Xu Y, Wang D, Mu X Q, et al. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2002, 18(1): 29-37.

[14] 金亮, 徐岩, 曹光群. 华根霉全细胞脂肪酶催化合成油酸油醇酯. 催化学报, 2006, 27(7): 611-614.

Jin L, Xu Y, Cao G Q. Biosynthesis of oleyl oleate by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. Chinese Journal of Catalysis, 2006, 27(7): 611-614.

[15] 贺芹, 徐岩, 滕云, 等. 华根霉全细胞脂肪酶催化合成生物柴油. 催化学报, 2008, 29(1): 41-46.

He Q, Xu Y, Teng Y, et al. Biodiesel production catalyzed by whole-cell lipase from *Rhizopus chinensis*. Chinese Journal of Catalysis, 2008, 29(1): 41-46.

[16] Sun S Y, Xu Y. Solid-state fermentation for 'whole-cell synthetic lipase' production from *Rhizopus chinensis* and identification of the functional enzyme. Process Biochemistry, 2008, 43(2): 219-224.

[17] Teng Y, Xu Y. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. Bioresource Technology, 2008, 99(9): 3900-3907.

[18] Tamalampudi S, Talukder M R, Hama S, et al. Enzymatic production of biodiesel from Jatropha oil: a comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. Biochemical Engineering Journal, 2008, 39(1): 185-189.

[19] 李迅, 李治林, 何晓云, 等. 全细胞生物催化麻疯树油制备生物柴油的研究. 现代化工, 2008, 28(9): 57-59.

Li X, Li Z L, He X Y, et al. Study on producing biodiesel fuel from *Jatropha curcas* oil sources catalized by whole cell biocatalyst. Modern Chemical Industry, 2008, 28(9): 57-59.

[20] 李治林, 李迅, 王飞, 等. 全细胞生物催化制备生物柴油研究——全细胞生物催化剂催化豆油甲酯化反应. 林产化学与工业, 2009, 29(2): 1-5.

Li Z L, Li X, Wang F, et al. Study on biodiesel production by whole-cell biocatalyst——Methylation of soybean oil catalyzed by whole-cell biocatalyst. Chemistry and Industry of Forest Products, 2009, 29(2): 1-5.

[21] 里伟, 杜伟, 刘德华, 等. 固定化*R. oryzae*细胞发酵产胞内脂肪酶及其催化制备生物柴油. 高校化学工程学报, 2008, 22(5): 822-827.

Li W, Du W, Liu D H, et al. Intracellular lipase production by immobilized *R. oryzae* cell and its utilizing for whole cell catalyzed biodiesel production. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2008, 22(5): 822-827.

[22] Hermansyah H, Faiz M B, Arbianti R. Kinetic study of immobilized whole-cell lipase *Rhizopus Oryzae* as biocatalyst in biodiesel synthesis through non-alcohol route. International Journal of Environmental Science and Development, 2015, 6(6): 439-444.

[23] Zhou G, Chen G, Yan B. Two-step biocatalytic process using lipase and whole cell catalysts for biodiesel production from unrefined jatropha oil. Biotechnology Letters, 2015, 37(10): 1959-1963.

[24] Bharathiraja B, Jayamuthunagai J, Praveenkumar R, et al. The kinetics of interesterfication on waste cooking oil (sunflower oil) for the production of fatty acid alkyl esters using a whole cell biocatalyst (*Rhizopus oryzae*) and pure lipase enzyme. International Journal of Green Energy, 2015, 12(10): 1012-1017.

[25] Omar I C, Ilias N. Characteristics of cell-bound lipase production by a newly isolated strain of *Aspergillus flavus*. Pertanika Journal of Science and Technology, 1996, 4(1): 1-9.

[26] Yan H, Zhang Q, Wang Z. Biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters with high substrate loading by a whole-cell lipase from *Aspergillus oryzae*. Catalysis Communications, 2014, 45: 59-62.

[27] Li C, Li L, Zhou H, et al. Improving yield of 1,3-diglyceride by whole-cell lipase from *A. niger* GZUF36 catalyzed glycerolysis via medium optimization. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2015, 26(2): 247-254.

[28] Li C, Zhang F, Gao Z, et al. Effects of organic solvent, water activity, and salt hydrate pair on the sn-1,3 selectivity and activity of whole-cell lipase from *Aspergillus niger* GZUF36. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(1): 225-235.

[29] Guldhe A, Singh P, Kumari S, et al. Biodiesel synthesis from microalgae using immobilized *Aspergillus niger* whole cell lipase biocatalyst. Renewable Energy, 2016, 85: 1002-1010.

[30] Rakchai N, Aran H, Zimmermann W. The production of immobilized whole-cell lipase from *Aspergillus nomius* ST57 and the enhancement of the synthesis of fatty acid methyl esters using a two-step reaction. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2016, 133: S128-S136.

[31] Jacobsen T, Jensen B, Olsen J, et al. Extracellular and cell-bound lipase activity in relation to growth of *Geotrichum candidum*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 32(3): 256-261.

[32] Druet D, Abbadi N, Comeau L. Purification and characterization of the extracellular and cell-bound lipases from a *Penicillium cyclopium* variety. Applied Microbiology and Biotechnology, 1992, 37(6): 745-749.

[33] Yan J Y, Yan Y J. Optimization for producing cell-bound lipase from *Geotrichum* sp. and synthesis of methyl oleate in microaqueous solvent. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(3): 431-439.

[34] Yu L J, Xu Y, Wang X Q, et al. Highly enantioselective hydrolysis of DL-menthyl acetate to L-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007, 47(3): 149-154.

[35] Zha D, Xu L, Zhang H, et al. Molecular identification of lipase LipA from *Pseudomonas protegens* Pf-5 and characterization of two whole-cell biocatalysts Pf-5 and Top10lipA. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(5): 619-28.

[36] 赖学能，李晓凤，赵光磊. 秦皮甲素酰化反应中脂肪酶诱导剂对全细胞催化行为的影响及其产物结构鉴定. 现代食品科技, 2015, 31(7): 37-43.

Lai X N, Li X F, Zhao G L. Effect of lipase induction on whole-cell biocatalyst behavior during esculin acylation and structural identification of products. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(7): 37-43.

[37] dos Santos J B C, da Silva Cruz R G, Tardioli P W. Production of whole-cell lipase from *Streptomyces clavuligerus* in a bench-scale bioreactor and its first evaluation as biocatalyst for synthesis in organic medium. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 183(1): 218-240.

[38] Chen R R. Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering. Applied Microbiology and Biotechnology, 2007, 74(4): 730-738.

[39] Matsumoto T, Takahashi S, Kaieda M, et al. Yeast whole-cell biocatalyst constructed by intracellular overproduction of *Rhizopus oryzae* lipase is applicable to biodiesel fuel production. Applied Microbiology and Biotechnology, 2001, 57(4): 515-520.

[40] Adachi D, Hama S, Nakashima K, et al. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. Bioresource Technology, 2013, 135: 410-416.

[41] Amoah J, Ho S H, Hama S, et al. Converting oils high in phospholipids to biodiesel using immobilized *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalysts expressing *Fusarium heterosporum* lipase. Biochemical Engineering Journal, 2016, 105: 10-15.

[42] Amoah J, Ho S H, Hama S, et al. Conversion of *Chlamydomonas* sp. JSC4 lipids to biodiesel using *Fusarium heterosporum* lipase-expressing *Aspergillus oryzae* whole-cell as biocatalyst. Algal Research, 2017, 28: 16-23.

[43] Jung H C, Ko S, Ju S J, et al. Bacterial cell surface display of lipase and its randomly mutated library facilitates high-throughput screening of mutants showing higher specific activities. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2003, 26(3): 177-184.

[44] Jung H C, Kwon S J, Pan J G. Display of a thermostable lipase on the surface of a solvent-resistant bacterium, *Pseudomonas putida* GM730, and its applications in whole-cell biocatalysis. BMC Biotechnology, 2006, 6(1): 23.

[45] Lee S H, Choi J I, Han M J, et al. Display of lipase on the cell surface of *Escherichia coli* using OprF as an anchor and its application to enantioselective resolution in organic solvent. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 90(2): 223-230.

[46] Lee S H, Lee S Y, Park B C. Cell surface display of lipase in *Pseudomonas putida* KT2442 using OprF as an anchoring motif and its biocatalytic applications. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8581-8586.

[47] Kim S J, Song J K, Kim H K. Cell surface display of *Staphylococcus haemolyticus* L62 lipase in *Escherichia coli* and its application as a whole cell biocatalyst for biodiesel production. Journal of Molecular Catalysis B:

Enzymatic, 2013, 97: 54-61.

[48] 黎小军，林陈水. *Burkholderia cepacia* XYU-6脂肪酶的克隆及其细胞表面展示. 江西师范大学学报（自然科学版), 2015, 39(5): 502-506.

Li X J, Lin C S. The cloning and cell surface display of a lipase from *Burkholderia cepacia* XYU-6. Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science), 2015, 39(5): 502-506.

[49] 王雨. 变形杆菌脂肪酶在大肠杆菌中的表面展示及其制备生物柴油研究. 武汉：湖北大学, 2016.

Wang Y. *Proteus* sp. lipase displayed on *Escherichia coli* cell surface and its application in biodiesel production. Wuhan: Hubei University, 2016.

[50] 田淑芳，王雨，李春华. 变形杆菌脂肪酶在大肠杆菌细胞表面的展示表达及重组酶的特性. 湖北大学学报（自然科学版), 2018, 40(1): 1-6.

Tian S F, Wang Y, Li C H. Display expression of a lipase from *Proteus* sp. on the *Escherichia coli* cell surface and characterization of the recombinant enzyme. Journal of Hubei University (Natural Science), 2018, 40(1): 1-6.

[51] Chen H, Tian R, Ni Z, et al. Surface display of the thermophilic lipase Tm1350 on the spore of *Bacillus subtilis* by the CotB anchor protein. Extremophiles, 2015, 19(4): 799-808.

[52] Jawad Ullah. 连接肽对枯草杆菌芽孢衣壳蛋白B表面展示海栖热袍菌脂肪酶Tm1350的影响. 镇江：江苏大学, 2017.

Jawad U. Impact of peptide linkers on *T. maritima* lipase Tm1350 displayed on *B. subtilis* spore surface using CotB as fusion partner. Zhenjiang: Jiangsu University, 2017.

[53] Kim J. Surface display of lipolytic enzyme, lipase A and lipase B of *Bacillus subtilis* on the *Bacillus subtilis* spore. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2017, 22(4): 462-468.

[54] 刘文山. 脂肪酶在酿酒酵母中的表面展示研究. 武汉：华中科技大学, 2010.

Liu W S. Surface display of lipases in *Saccharomyces cerevisiae*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010.

[55] 潘小幸. 白地霉脂肪酶在酿酒酵母和毕赤酵母细胞表面的展示研究. 武汉：华中科技大学, 2012.

Pan X X. Surface display of *Geotrichum candidum* lipase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012.

[56] 赵敏洁，蔡海莺，李杨，等. 脂肪酶的酵母细胞表面展示及其应用. 中国食品学报, 2017, 17(5): 152-160.

Zhao M J, Cai H Y, Li Y, et al. Yeast cell surface display for lipase and its applications. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2017, 17(5): 152-160.

[57] Li W, Shi H, Ding H, et al. Cell surface display and characterization of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using Sed1p as an anchor protein. Current Microbiology, 2015, 71(1): 150-155.

[58] Moura M V H, Silva G P D, Freire D M G, et al. Displaying lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia*

pastoris using the yeast surface display approach: prospection of a new anchor and characterization of the whole cell biocatalyst. PloS One, 2015, 10(10): e0141454.

[59] Wang P, He J, Sun Y, et al. Display of fungal hydrophobin on the *Pichia pastoris* cell surface and its influence on *Candida antarctica* lipase B. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(13): 1-13.

[60] 张蕊. 酿酒酵母细胞表面展示米根霉脂肪酶制备全细胞催化剂及其特性研究. 北京: 北京化工大学, 2015.

Zhang R. *Rhizopus oryzae* lipase surface displaying on *Saccharomyces cerevisiae* as whole-cell catalyst and its properties. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2015.

[61] Yuzbasheva E Y, Yuzbashev T V, Perkovskaya N I, et al. Cell surface display of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2p using the cell wall protein YlPir1p, its characterization, and application as a whole-cell biocatalyst. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(8): 3888-3900.

[62] 代敏. 具有协同效应的南极假丝酵母脂肪酶B和疏棉状嗜热丝孢菌脂肪酶在毕赤酵母中的共展示研究. 武汉: 华中科技大学, 2012.

Dai M. Surface display of *Candida antarctica* lipase B and *Thermomyces lanuginosus* lipase with synergy in *Pichia pastoris*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012.

[63] Yan Y J, Xu L, Dai M. A synergetic whole-cell biocatalyst for biodiesel production. RSC Advances, 2012, 2(15): 6170-6173.

[64] 吴慧娟. 黑曲霉脂肪酶A在毕赤酵母细胞表面的展示研究. 武汉: 华中科技大学, 2013.

Wu H J. Surface display of *Aspergillus niger* lipase A in *Pichia pastoris*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2013.

[65] 张燕. 在毕赤酵母表面共展示具有协同效应的米根霉脂肪酶和褶皱假丝酵母脂肪酶LIP1的研究. 武汉: 华中科技大学, 2014.

Zhang Y. Co-display of *Rhizopus oryzae* lipase and *Candida rugosa* lipase 1 with synergy on the cell wall of *Pichia pastoris*. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.

[66] 李锚. 表面共展示南极假丝酵母脂肪酶B与嗜热丝孢菌脂肪酶全细胞催化剂制备及其制备生物柴油研究. 武汉: 华中科技大学, 2014.

Li M. Whole-cell catalyst preparation of surface co-displayed *Candida antarctica* lipase B and *Thermomyces lanuginosus* lipase and its application in biodiesel production. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2014.

Research advances in whole-cell lipases

SHI Hong-qiu　ZHA Dai-ming　ZHANG Bing-huo　LI Han-quan

(School of Pharmacy and Life Sciences, Jiujiang University, Jiujiang　332000, China)

Abstract Lipases being important industrial enzyme, which have been widely used in many industrial fields. Compared with free lipases and physical or chemical immobilized lipases, whole-cell lipases have the advantages of simple preparation, no protein extraction and purification, natural immobilization, better stability and resistance, low cost of preparation and equipment, etc. Therefore, the utilization of lipases in the form of whole-cell is known as one of the most promising ways to reduce the cost of biotransformation. The study on whole-cell lipases has always been a hot spot in the lipase field. In this paper, the research advances in whole-cell lipases, including the wild-type whole-cell lipases and the gene engineered whole-cell lipases, were summarized and reviewed. Furthermore, the future research directions of whole-cell lipases were prospected so as to provide a useful reference for the follow-up studies.

Key words Whole-cell lipase Research advance Review